

(b)

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-065253

(43)Date of publication of application : 05.03.2002

(51)Int.Cl.

C12N 5/06  
A61K 35/14  
A61K 35/28  
A61P 17/00  
A61P 29/00  
A61P 37/00  
A61P 37/08

(21)Application number : 2000-264313

(71)Applicant : ASAHI KASEI CORP  
ASAHI MEDICAL CO LTD

(22)Date of filing : 31.08.2000

(72)Inventor : ENOMOTO MAKOTO  
TAKAHASHI TSUNEO

(54) DENDRITIC CELL AND CELL PREPARATION CONTAINING THE SAME AS PRINCIPAL INGREDIENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a dendritic cell capable of inducing immunotolerance, and to provide a cell preparation by using the same.

SOLUTION: This dendritic cell is obtained by subjecting a precursor cell of the dendritic cell to differentiation induction in the presence of soluble or solidified fibronectin and a differentiation-inducing agent to prepare the dendritic cell on which manifestation of a sub-stimulant molecule, such as MHC(major histocompatibility complex) class-II and CD(cluster of differentiation) 80 molecule, is decreased. The cell preparation contains the dendritic cell as the principal ingredient. The preparation induces refractoriness of immunocyte, such as T-lymphocyte, so that the preparation can be used for treating allergic diseases in a state of immunological exaltation.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-65253

(P 2 0 0 2 - 6 5 2 5 3 A)

(43) 公開日 平成14年3月5日(2002.3.5)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C12N 5/06		A61K 35/14	Z 4B065
A61K 35/14		35/28	4C087
35/28		A61P 17/00	
A61P 17/00		29/00	101
29/00	101	37/00	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全9頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-264313 (P 2000-264313)	(71) 出願人	000000033 旭化成株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22) 出願日	平成12年8月31日(2000.8.31)	(71) 出願人	000116806 旭メディカル株式会社 東京都千代田区神田美土代町9番地1
		(72) 発明者	榎本 誠 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内
		(72) 発明者	高橋 恒夫 東京都港区白金台4-5-7-401
		(74) 代理人	100090941 弁理士 藤野 清也 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状細胞及びそれを主成分とする細胞製剤

(57) 【要約】

【課題】 免疫寛容を誘導しうる細胞及びその製剤の提供。

【解決手段】 樹状細胞の前駆細胞を、可溶性または固相化ファイブロネクチンと分化誘導剤との存在下で分化誘導し、MHC クラスII、CD80分子等の副刺激分子の発現が低下した樹状細胞を調製する。また、この樹状細胞を主成分とする細胞製剤。Tリンパ球などの免疫細胞の不応答性を誘導し、免疫亢進状態のアレルギー疾患の治療に用いることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 樹状細胞の前駆細胞から、可溶性もしくは固相化ファイブロンネクチン分子と分化誘導剤との存在下で分化誘導培養を経て作製された、MHC クラス II、CD 40、CD80、CD86 分子の中から選ばれる少なくとも 1 種の分子の発現が抑制されまたは陰性である樹状細胞。

【請求項 2】 樹状細胞の前駆細胞が、骨髓細胞、臍帯血由来細胞、または末梢血由来細胞である請求項 1 に記載の樹状細胞。

【請求項 3】 分化誘導剤として、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン-4 (IL-4) の組み合わせ、あるいは GM-CSF、IL-4、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の組み合わせが用いられる請求項 1 または 2 に記載の樹状細胞。

【請求項 4】 可溶性または固相化ファイブロンネクチンが、ヒト由来のファイブロンネクチンである請求項 1～3 のいずれかに記載の樹状細胞。

【請求項 5】 樹状細胞の前駆細胞を、可溶性もしくは固相化ファイブロンネクチン分子と分化誘導剤との存在下で分化誘導培養することを特徴とする、MHC クラス II、CD 40、CD80、CD86 分子の中から選ばれる少なくとも 1 種の分子の発現が抑制されまたは陰性である樹状細胞の製造法。

【請求項 6】 樹状細胞の前駆細胞が、骨髓細胞、臍帯血由来細胞、または末梢血由来細胞である請求項 5 に記載の樹状細胞の製造法。

【請求項 7】 分化誘導剤として、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン-4 (IL-4) の組み合わせ、あるいは GM-CSF、IL-4、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の組み合わせが用いられる請求項 5～6 のいずれかに記載の樹状細胞の製造法。

【請求項 8】 可溶性または固相化ファイブロンネクチンとして、ヒト由来のファイブロンネクチンを用いる請求項 5～7 のいずれかに記載の樹状細胞の製造法。

【請求項 9】 請求項 1～4 のいずれかに記載の樹状細胞を主成分とする細胞製剤。

【請求項 10】 請求項 1～4 のいずれかに記載の樹状細胞を主成分とし、製剤化することを特徴とする細胞製剤の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、免疫寛容を誘導しうる樹状細胞及びそれを主成分とする細胞製剤に関する。さらに、本発明はこれらの製造法に関する。本発明の細胞製剤は、自己免疫疾患またはアレルギー疾患の治療に有効である。

## 【0002】

【従来の技術】 自己免疫疾患やアレルギー疾患に対する治療は、メソトレキセート、サイクロスポリン A や FK506 などの免疫抑制剤、または抗ヒスタミン剤、非ステロ

イド剤、ステロイド剤などの抗アレルギー剤や抗炎症剤を投与し、炎症を沈静化することに主眼をおいた薬物治療法が行われている。しかし、免疫抑制剤では白血球減少や臓器障害、抗アレルギー剤や抗炎症剤では、免疫抑制などの強い副作用が出たり、効果が出るまでに時間がかかるなど満足する治療効果は得られていない。

【0003】 自己免疫疾患は、慢性関節リウマチなどの全身性自己免疫疾患と多発性硬化症や慢性甲状腺炎などの臓器特異的自己免疫疾患がある。これまでの自己免疫疾患病態モデル動物を用いた研究から、いずれの場合にも免疫系制御機構の破綻から生成した自己反応性ヘルパー T 細胞が疾患の発症に重要な役割を果たしていることが示されている。また、アレルギー疾患では、機能が異常となった好酸球やヘルパー T 細胞、肥満細胞などが炎症部位に浸潤していることが知られている。

【0004】 一方、最近の研究から、自己免疫疾患の慢性関節リウマチやアレルギーのアトピー性皮膚炎において、その病巣部位に存在する樹状細胞が機能亢進しており、さらに細胞表面上に主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II タンパク質や CD40、CD80、CD86 などの副刺激因子が強発現し、これが自己反応性 T 細胞の過剰増殖あるいは、アレルゲンに対して過敏反応する T 細胞の増殖に関わっていることが報告されている (MacDonald et al. (1999) J. Immunology 163:5599, Oki et al. (1997) Brit. J. Dermatol. 136:838)。

【0005】 自己免疫疾患やアレルギーの治療法には、上述した自己反応性細胞や、アレルゲン過敏反応細胞の増殖をいかに抑制するか、すなわち、自己に反応する細胞や、アレルゲンに反応する細胞に対して免疫寛容を誘導させることが重要と考えられている。

【0006】 強力な抗原提示細胞である樹状細胞は、抗原提示の役割を果たす際に、MHC クラス I タンパク質及びクラス II タンパク質または CD40、CD80、CD86 などの副刺激因子を高発現する。通常樹状細胞がヘルパー T 細胞に抗原提示する際には、MHC クラス II および上記副刺激因子の二つの分子から刺激が入ることが重要である。しかし、副刺激因子からの刺激が、弱いもしくは無い場合には免疫不応答に陥り、ヘルパー T 細胞の免疫寛容が誘導されることが知られている。この現象は、本来 T 細胞の過剰反応を抑制するための negative feedback 機構を担うものである。

【0007】 上記の疾患に対しては、このメカニズムを応用して樹状細胞の機能亢進および副刺激因子の発現を何らかの方法で抑制して、免疫寛容を誘導できる樹状細胞を用いて治療できる可能性があると考えられている。

【0008】 自己免疫疾患やアレルギーの患者に対しては、免疫抑制剤や抗炎症剤などによる副作用が起らないような比較的安全な治療方法が望まれている。現在、こうした状況を解決すべく、自己抗原やアレルゲンに対して特異的な免疫抑制による副作用の軽減、あるいは自

己抗原やアレルゲンが同定できていない場合においても、副作用のない免疫抑制療法の開発が期待されている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、免疫寛容を誘導しうる樹状細胞及びそれを主成分とする細胞製剤を提供することを目的とする。さらに本発明は、このような樹状細胞及びそれを主成分とする細胞製剤の製造法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】樹状細胞のMHCクラスIタンパク質及びクラスIIタンパク質またはCD40、CD80やCD86などの副刺激因子の発現を抑制させて、免疫寛容を誘導させる研究については、最近、インターロイキン-10(IL-10)や活性型ビタミンD<sub>3</sub>が、樹状細胞のMHCクラスIおよび副刺激因子の発現を抑制することがわかっており、これらの薬剤で処理した樹状細胞による免疫寛容誘導の可能性が示唆されている(Steinbrink et al. (1997) J. Immunology 159:4772, Diemonti et al. (2000) J. Immunology 164:4443)。

【0011】また、動物実験レベルでの研究では、全身性エリテマトーデスの発症マウスにおいて、脾臓に存在する自己抗原を提示しうる樹状細胞を取り出して、パラホルムアルデヒドやECDI (1-ethyl-3 (3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide)などの化学試薬で固定して、副刺激因子の発現を抑えることにより、その機能を阻害してT細胞の免疫麻痺を誘導し、病状を緩和させることに成功したという報告がある(邵東子ら、日本免疫学会1993)。

【0012】しかしながら、前者の方法は元来樹状細胞に分化することを別の系統の血液細胞への分化を誘導する方法であり、後者は薬剤固定に伴う蛋白変性を起こし、抗原性を持つなどの問題があり、必ずしも最適な方法とはならない。

【0013】本発明者らは、さらに効果的に免疫寛容を誘導しうる樹状細胞を作製し、これを主成分とする樹状細胞製剤を得て、自己免疫疾患及びアレルギー疾患の患者の治療ができるように多くの誘導条件の検討を重ね、鋭意努力した結果、本発明をもってすれば、抗原提示能を効果的に抑制しうることを見出し、本発明を完成した。

【0014】すなわち、本発明は、樹状細胞の前駆細胞から、可溶性もしくは固相化ファイブロンネクチン分子と分化誘導剤との存在下で分化誘導培養を経て作製された、MHCクラスII、CD40、CD80、CD86分子の中から選ばれる少なくとも1種の分子の発現が抑制されあるいは陰性である樹状細胞に関する。本発明における、樹状細胞の前駆細胞としては、骨髓細胞、臍帯血由来細胞、末梢血由来細胞等が用いられる。また、分化誘導剤には、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インタ

ーロイキン-4(IL-4)の組み合わせ、あるいはGM-CSF、IL-4、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )の組み合わせを用いることが好ましい。可溶性または固相化ファイブロンネクチンとしては、ヒト由来のファイブロンネクチンが望ましい。

【0015】さらに、本発明は、これらの樹状細胞を製造する方法に関する。すなわち、樹状細胞の前駆細胞を、可溶性もしくは固相化ファイブロンネクチンと分化誘導剤との存在下で分化誘導培養することからなる前記の樹状細胞の製造法に関する。本発明における樹状細胞の前駆細胞としては、前記のように骨髓細胞、臍帯血由来細胞、末梢血由来細胞等が用いられる。また、誘導剤には、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-4(IL-4)の組み合わせ、あるいはGM-CSF、IL-4、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )の組み合わせを用いることが望ましい。可溶性または固相化ファイブロンネクチンとしては、ヒト由来のファイブロンネクチンが望ましい。

【0016】また、本発明は、前記の樹状細胞を主成分とする細胞製剤に関する。さらに本発明は、前記の樹状細胞を主成分とし、製剤化を行うことによる細胞製剤の製造法に関する。

【0017】以下、本発明に関して詳細に説明する。本発明において、ファイブロンネクチン分子とは、各種生物から分離されたファイブロンネクチンを意味するが、ヒト由来のファイブロンネクチンであることが好ましい。また、その存在形態は可溶性または固相化の形態を取りうる。可溶性とは培地中に溶けた状態で存在し、固相化とは培養容器などの固体、担体などの表面に存在する状態を意味する。固相化とは実施例のような静電的な方法で固相化したものから、架橋剤などで表面に共有結合させたものなどまで幅広い方法が挙げられる。また、本発明においてファイブロンネクチン分子とは、血漿から精製したファイブロンネクチン、または遺伝子組み換えにより得られたファイブロンネクチンの二種類のソースが利用でき、また、ファイブロンネクチン由来のRGD付着促進ペプチド、加水分解等の方法で断片化されたファイブロンネクチン分子をも含む。つまり、広義のファイブロンネクチン由来のペプチド分子を意味する。

【0018】本発明において、実施例並びに図1、2に示したCD40、CD80、CD86、HLA-DR(MHCクラスIIの一つ)の抗原の発現が抑制されているとは、規定として、コントロールであるIL-4、GM-CSFで誘導した未成熟樹状細胞(図1、2において上段の太線で記載)に比べて、ファイブロンネクチンによる処理で誘導した未成熟樹状細胞の発現レベル(図1、2において下段の太線で記載)が、5倍以上の平均蛍光強度の減弱を認めることを発現の抑制があったとする。より望ましくは10倍以上の平均蛍光強度の減弱を意味する。また、発現が陰性であるとは抗体を添加しなかった場合のネガティブコントロール(図1、2において細線で記載)の平均蛍光強度とほぼ同等、

すなわち平均蛍光強度が2倍以下であるものとする。

【0019】本発明におけるCD分子などについては、右田、高橋著、医学の歩み：別冊CD抗原ハンドブック、医歯薬出版株式会社(1999)を参考にすれば理解される。特に、CD80分子とは別名B7-1分子として知られ、リンパ球上のCD28、CTLA-4を介して活性化を補強する。また、CD86分子はB7-2分子として知られ、同様な作用を有していることが知られている。

【0020】本発明者によれば、骨髓液、臍帯血、もしくは末梢血由来の樹状細胞の前駆細胞をインビトロで、可溶性ファイブロンネクチン、あるいは固相化ファイブロンネクチンの存在下において培養することにより、分化誘導して得られた樹状細胞が、抗原提示能を強く抑制することを見出しこの細胞を採取し、さらにこれを主成分とする、その作用によって効果的な細胞製剤として利用しうること成功した。本発明によれば、樹状細胞の前駆細胞をGM-CSF、IL-4と、可溶性ファイブロンネクチンを添加して培養、もしくはファイブロンネクチンを固相化した材料上にてGM-CSF、IL-4の存在下で培養して得られる、分化誘導された樹状細胞は、通常の方法により分化誘導させた樹状細胞よりも、抗原提示能を強く抑制する細胞であることを見出した。

【0021】本発明の樹状細胞を有効成分とする細胞製剤は、MHC非特異的にリンパ球の活性化を抑制することも見出し、自家の細胞製剤のみならず、同種用細胞製剤として利用しうることを見出した。また当該細胞製剤は、自己抗原、あるいはアレルゲンに対して特異的な病的な免疫反応を抑制できるが、発症に関与する抗原やアレルゲンが同定できていない疾患に対しても、リンパ球の活性化を抑制することも見出した。本発明の抗原提示能の強く抑制された細胞製剤の製造法は、このような細胞を主成分として工業的に簡単かつ容易に製造できる。

【0022】本発明の樹状細胞を有効成分とする細胞製剤は、直接体内に投与することもできるが、インビトロにおいて、自己反応性、あるいはアレルゲン特異的反応性細胞に対する、免疫麻痺誘導のスクリーニングなどに利用することもできる。その際のリンパ球は、自家由来を利用しうるが、同種由来においても効率よく利用することができることを見出した。

【0023】樹状細胞の前駆細胞を培養することによって、機能的な樹状細胞が、大量に細胞製剤の有効成分として提供される。分化誘導した樹状細胞は、インビトロ分析及び免疫調節治療において使用するため、特に自己反応性のメモリーT細胞、またはアレルゲン反応性のメモリーT細胞を免疫麻痺するための、免疫抑制細胞の起源として用いることができる。

【0024】樹状細胞の前駆細胞のソースとして、骨髓、臍帯血、あるいは末梢血由来の造血幹細胞、または末梢血由来の単球細胞を利用しうる。臍帯血は注射筒により取得することができる。樹状細胞の前駆細胞は、採

取した骨髓液、臍帯血、あるいは末梢血液より分離精製することが望ましい。有核細胞を赤血球から分離するいかなる方法も採用することができる。フィコール分画つまりフィコルーバック(Ficoll-Paque)密度勾配または溶出を利用する方法が、一般的に使用される。代替法として、血液細胞を、成人の赤血球を選択的に溶解する溶液、例えばアンモニウムクロライド-カリウム(ammoniumchloride-potassium)、アンモニウムオキサレート(ammoniumoxalate)などに懸濁し、分離することができる。

【0025】樹状細胞の分化誘導の培養には、RPMI-1640培地、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、イスコフ培地(IMDM)など、適当な市販されている培地を使用しうる。臨床的にはX-VIVO15培地(Biowittaker社)等がより好ましい。血清は、5-20%程度の牛血清、牛胎児血清、もしくはヒト血清などが使用しうる。無血清で使うことが好ましいが、必要に応じ牛アルブミン(BSA)、ヒトアルブミン(HSA)などを添加しうる。必要に応じ適当な抗生物質、抗体、ビルビン酸(0.1-5mM)、グルタミン(0.5-5mM)、2-メルカプトエタノール(10-100μM)を含んでいてもよい。

【0026】これらの培地に分化誘導剤を添加し、約37℃、約5%炭酸ガス雰囲気下で5日から21日程度培養する。7日から14日程度の培養が望ましい。培養温度(34~38℃)、ガスの混合比(炭酸ガス2~10%、さらには窒素ガス、もしくは酸素ガスを適宜混合しうる。)は、適切な条件を設定して行うことができる。

【0027】樹状細胞の前駆細胞を含む細胞群から樹状細胞への分化誘導には、適切な誘導剤を使用する必要がある。誘導剤として、サイトカイン類から選択して使用することができる。サイトカインとして、適切なものを使用すれば良いが、特に1~1000ng/ml濃度範囲程度のGM-CSF、IL-4、ステムセルファクター(SCF)、インターロイキン-13(IL-13)、TNF-α、Flt3-Ligandなどが効率よく使用しうる。インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-3(IL-3)などの添加も利用しうる。望ましくはGM-CSF、IL-4の組み合わせ、GM-CSF、IL-4、TNF-αの組み合わせ等がより効率的である。これらの組み合わせを利用した培養系にファイブロンネクチンを添加することで、抗原提示能を制御させた細胞群を製造することが可能となる。

【0028】この培養に使用するサイトカインは、マウスなどの異種動物由来の因子も利用しうるものがあるが、望ましくはヒト由来の因子が望ましい。これらのサイトカインは、ベーリンガー社、PeptoTech社(免疫生物研究所社扱い)など商業的に多数の会社から市販されているものも多く、それぞれ同等に使用しうる。用いられる因子は、天然由来または合成、例えば遺伝子組換えにて調製されたものでもよい。単核細胞、リンパ球、もしくはある種の細胞株の培養上清は、サイトカインの源として用いることもできる。培養する際のサイトカイン

の濃度は1ng/ml~10 $\mu$ g/mlの濃度範囲で使用するのが望ましく、特に10~1000ng/mlの濃度範囲がより望ましい。

【0029】樹状細胞の抗原提示活性は、それを検出するさまざまな方法が知られており、それらを利用することができる。例えば、リンパ球混合培養反応試験として、最適条件には及ばない濃度の抗CD3抗体で刺激された単離T細胞の増殖を促進する活性により、細胞の能力を測定することができる(Thomas(1994) J. Immunol. 153:4016-4028)。

【0030】培養の途中または培養後の樹状細胞群は、インビオまたはインビトロでT細胞の増殖抑制、免疫麻痺を誘導する抗原提示細胞として用いることができる。タンパク質抗原またはそのペプチドを細胞内に取り込ませ修飾後細胞表面に提示させる、もしくは、直接細胞表面に提示させる。抗原性のペプチドは通常、長さが約6個~20個のアミノ酸からなり、更に通常は約10個~18個のアミノ酸からなる。このペプチドは広い範囲のさまざまなタンパク質から誘導される配列を有している。多くの場合、T細胞抗原決定基、通常は主要抗原決定配列として作用するペプチドを用いることが望ましい。

【0031】本発明の細胞製剤は、前記の樹状細胞を主成分とするがこの副成分として各種のペプチド、その他の細胞を例示することができる。本発明の細胞製剤は、ヒト体内に治療用の細胞製剤として接種することから、細胞増殖性を無くしておくことより安全である。細胞製剤として、より安全に利用するため加熱処理、放射線処理、あるいはマイトマイシンC処理など、細胞製剤としての機能を残しつつ、病原細胞のタンパク質が変性する程度の条件下で処理をすることができる。

【0032】例えば、X線照射を利用する場合、X線照射器の管球の下に樹状細胞を懸濁させた生理食塩水を含むフラスコを置き、総放射線量1000~3300 Radで照射する。マイトマイシンC処理法は、例えば、樹状細胞を1~3 $\times 10^7$ 個細胞/mlの密度で懸濁し、細胞浮遊液1ml当たりマイトマイシンC25~50 $\mu$ gの比で添加して、37℃、30~60分間保温処理する。熱による細胞処理方法は、例えば生細胞濃度を1 $\times 10^7$ 個/mlに調製した細胞懸濁液を入れた遠心管を50~65℃で20分間加熱処理を行うことで調製しうる。

【0033】本発明の細胞製剤は、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、ベーチェット病、橋本病などの自己免疫疾患、及びアトピー性皮膚炎、食物アレルギー等によるアレルギーに対し利用しうる。本発明の細胞製剤の投与量は、患者の年齢、体重、性別、疾患の種類及び進行度、症状等により異なり、一概に決定できないが、現在行われている癌に対する細胞ワクチン療法で注入されるのと同程度の量が患者に投与されればよい。たとえば、投与としては週に一度、患者一人あたり1 $\times 10^7$  cellsを10週間にわたって投与するプロトコールがあ

げられる。本発明による樹状細胞ワクチンは、患者本人に使用することもできるが、骨髄バンク、臍帯血バンクの発達により、MHC適合の同種の多数の患者に投与することができる。

【0034】樹状細胞の前駆細胞から樹状細胞を調製するに際し、付加的に自己抗原ペプチドあるいはアレルゲンを添加し、その抗原の提示細胞としても活用しうる。添加は、分化誘導の培養時に添加してもよく、樹状細胞に分化させた後に添加することもできる。樹状細胞は、少なくとも約0.1 $\mu$ Mから1mMの濃度の抗原を含む生理学的に許容しうる緩衝液に、その細胞を入れることによって抗原で刺激される。ペプチド抗原は通常、完全なタンパク質抗原、または細胞溶解物よりも低い濃度で効果を得ることができる。抗原性のペプチドは通常、長さが約6個~20個のアミノ酸からなり、更に通常は約10個~18個のアミノ酸からなる。その樹状細胞は、一般的には37℃で、抗原がその細胞に結合するのに十分な時間、抗原とともにインキュベートすることができる。ペプチド抗原は通常、少なくとも約1時間、及び6時間またはそれ以上の時間インキュベートが行われる。完全なタンパク質抗原では通常、少なくとも約3時間、及び約12時間またはそれ以上の時間インキュベートが行われることが望ましい。

【0035】抗原で刺激した樹状細胞またはその膜成分は、抗原特異的なT細胞を増殖抑制するための免疫抑制細胞製剤として用いてもよい。本発明の細胞製剤は、細胞を移動、保存させるに効果的な容器に入れておくことが望ましい。例えば、クライオバイアル、凍結用血液バッグ、輸血用血液バッグなどが有用である。ジメチルスルホキシドなどを添加し、凍結用の保存液を調製することで、凍結保存することも可能である。培養用の気相交換ができる血液バッグを利用することで、閉鎖系で培養から、洗浄、回収、保存など効率よく細胞製剤として調製、利用することができる。

【0036】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明する。しかし、本発明は、これらに限定されるものでない。

【実施例1】健康人末梢血 400mlからバッフィーコート50を回収し、フィコール分画で単核細胞層の細胞を取得した。得られた細胞から培養シャーレ(Falcon社)を用いて付着細胞を回収した。得られた単球細胞を37℃、5%炭酸ガス雰囲気下で7日、もしくは11日間培養し、樹状細胞に分化させた。培地は、10%牛胎児血清(FBS: Intergen社)とantimycotic-antibiotics(Gibco BRL社)を添加したRPMI-1640培地に、培養開始後7日間は100ng/mlヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)と50ng/mlヒトインターロイキン-4(IL-4)、100 $\mu$ g/ml可溶性ファイブロンネクチン(旭テクノグラス社)を添加した。必要に応じ培地の交換を行った。これにより、

健康者の末梢血単球からの樹状細胞の調製を行った。

【 0 0 3 7 】

【実施例 2】実施例 1 で調製して得た樹状細胞の表面抗原の検出をフローサイトメーターを用いて行った。測定する細胞を、マウス正常血清 (DAKO社) を含むリン酸生理食塩水に目的の抗体を添加し、4℃で30分染色した。染色した抗体は、PE標識、もしくはFITC標識のCD1a(Coulter社)、CD4、CD11c、CD13、CD14、CD19、CD33、CD34(HPCA-1)、CD45、HLA-DR (以上、Beckton-Dickinson社)、CD40、CD80、CD86 (Pharmingen社)、CD83 (イムノテック社)。ネガティブコントロール抗体として、アイソタイプを合わせた抗体を利用した。染色した細胞を洗浄後 FACS Calibur (Beckton-Dickinson社) で測定した。図 1 にフローサイトメーターによる表面抗原の解析結果を示す。各図の縦軸は細胞数(counts)を示し、横軸は蛍光標識抗体により検出された各抗原量 (各細胞 1 個あたりの蛍光強度) を示す。上段及び下段とも蛍光標識抗体で染色したものを太線で、抗体染色しないコントロールを細線で示した。

【 0 0 3 8 】 IL-4、GM-CSF、可溶性ファイブロンネクチンで培養した細胞 (下段の太線) は、従来の末梢血単球から IL-4、GM-CSF で培養して得られた未成熟樹状細胞 (上段の太線) に比べて、CD40、CD80、CD86、HLA-DR の表面マーカーの発現が抑制されていることを確認した。特に、CD80 分子に関しては、発現がまったく認められなかった。

【 0 0 3 9 】

【実施例 3】健康人末梢血 400ml からパuffyコート を回収し、フィコール分画で単核細胞層の細胞を取得した。得られた細胞からファイブロンネクチンを固相化した培養シャーレ (バイオコート Beckton-Dickinson社) を用いて付着細胞を回収した。得られた単球細胞を37℃、5%炭酸ガス雰囲気下で7日、もしくは11日間培養し、樹状細胞に分化させた。培地は、10%牛胎児血清 (FBS: Intergen社) と antimycotic-antibiotics (Gibco BRL社) を添加したRPMI-1640培地に、培養開始後7日間は100ng/ml ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) と 50ng/ml ヒトインターロイキン-4 (IL-4) を添加させた。必要に応じて培地の交換を行った。これにより、健康者の末梢血単球からの樹状細胞の調製を行った。

【 0 0 4 0 】

【実施例 4】実施例 3 で調製して得た樹状細胞の表面抗原の検出をフローサイトメーターを用いて行った。測定する細胞を、マウス正常血清 (DAKO社) を含むリン酸生理食塩水に目的の抗体を添加し、4℃で30分染色した。染色した抗体は、PE標識、もしくはFITC標識のCD1a(Coulter社)、CD4、CD11c、CD13、CD14、CD19、CD33、CD34(HPCA-1)、CD45、HLA-DR (以上、Beckton-Dickinson社)、CD40、CD80、CD86 (Pharmingen社)、CD83 (イムノテック社)。ネガティブコントロール抗体として、ア

イソタイプを合わせた抗体を利用した。染色した細胞を洗浄後 FACS Calibur (Beckton-Dickinson社) で測定した。図 2 にフローサイトメーターによる表面抗原の解析結果を示す。各図の縦軸は細胞数(counts)を示し、横軸は蛍光標識抗体により検出された各抗原量 (各細胞 1 個あたりの蛍光強度) を示す。上段及び下段とも蛍光標識抗体で染色したものを太線で、抗体染色しないコントロールを細線で示した。

【 0 0 4 1 】 IL-4、GM-CSF、固相化ファイブロンネクチンで培養した細胞 (下段の太線) は、従来の末梢血単球から IL-4、GM-CSF で培養して得られた未成熟樹状細胞 (上段の太線) に比べて、CD40、CD80、CD86、HLA-DR の表面マーカーの発現が抑制されていることを確認した。特に、CD80 分子に関しては、発現がまったく認められなかった。

【 0 0 4 2 】

【実施例 5】実施例 1 で調製した末梢血由来の樹状細胞の抗原提示能をリンパ球混合培養反応試験により、インビトロで測定評価した。実施例 1 と異なる末梢血からフィコールにより単核細胞層を回収し、培養フラスコ (Falcon社) で、培養することにより、付着細胞を除去した。Eロゼット法により、Tリンパ球を単離した。単離したリンパ球  $1 \times 10^5$  と、15~30Gyで放射線処理した樹状細胞とを96穴プレートに撒き4日間培養した。その後、トリチウム-チミジンを取り込ませて、リンパ球の増殖を測定した。トリチウム-チミジンの測定は、取り込み培養18時間後にMicro Beta TRILUX 1450  $\beta$ -scintillation counter (Wallac社) で行った。樹状細胞は、実施例 1 と同様の方法、すなわち末梢血単球からGM-CSF、IL-4、可溶性ファイブロンネクチンを添加させて7日間の培養で得た樹状細胞を使用した。

【 0 0 4 3 】 樹状細胞のコントロールとしては、実施例 1 と同様にして末梢血の単球からGM-CSF、IL-4を添加して7日間の培養で得た樹状細胞を使用した。図 3 に、可溶性ファイブロンネクチンを添加して誘導した末梢血単球由来の樹状細胞の、リンパ球混合試験による抗原提示能を示す折線グラフを示す。縦軸はトリチウム標識チミジンの取り込量として放射活性を示した。横軸は樹状細胞の細胞数を示す。本培養反応試験の結果、末梢血単球から可溶性ファイブロンネクチンを添加して分化誘導して得た樹状細胞は、HLA の一致しないリンパ球に対しても、コントロールと比較して有意にリンパ球の増殖を抑制した。このことから、本発明による樹状細胞製剤は、従来の末梢血単球の樹状細胞の分化誘導条件に可溶性ファイブロンネクチンを加えることにより、免疫抑制効果のあることが示された。さらに、自家のみならず、MHCの一致しない樹状細胞でもリンパ球を増殖抑制することが示された。

【 0 0 4 4 】

【実施例 6】実施例 3 で調製した末梢血由来の樹状細胞



の抗原提示能を、リンパ球混合培養反応試験により、インビトロで測定評価した。実施例3と異なる健康人の末梢血からフィコールにより単核細胞層を回収し、培養フラスコ(Falcon社)で、培養することにより、付着細胞を除去した。Eロゼット法により、Tリンパ球を単離した。単離したリンパ球 $1 \times 10^5$ 個と、15から30Gyで放射線処理した樹状細胞とを96穴プレートに撒き4日間培養した。その後、トリチウム標識チミジンを取り込ませて、リンパ球の増殖を測定した。トリチウム標識チミジンの測定は、取り込み培養18時間後に Micro Beta TRIL 10 UX1450  $\beta$ -scintillation counter (Wallac社)で行った。樹状細胞は、実施例3と同様の方法、すなわち末梢血単球をファイブロネクチンを固相化した培養シャーレを用いて、GM-CSF、IL-4を添加させて7日間の培養で得た樹状細胞を使用した。樹状細胞のコントロールとしては、実施例3と同様にして末梢血単球を培養シャーレ(Falcon社)において、GM-CSF、IL-4の存在下で7日間の培養で得た樹状細胞を使用した。図4にファイブロネクチンを固相化した培養シャーレを用いて誘導した末梢血単球由来の樹状細胞の、リンパ球混合試験による抗原提示能を示す折線グラフを示した。縦軸はトリチウム標識チミジンの取り込量として放射活性を示した。横軸は樹状細胞の細胞数を示す。

【0045】本培養反応試験の結果、分化誘導して得た樹状細胞は、コントロールと比較して有意にリンパ球の増殖を抑制した。本発明による樹状細胞製剤は、従来の末梢血単球の樹状細胞の分化誘導条件に、ファイブロネクチンを固相化した培養シャーレを用いることにより、免疫抑制性効果があることが示された。本培養反応試験の結果、固相化ファイブロネクチン存在下で分化誘導して得た樹状細胞は、HLAの一致しないリンパ球に対して

も、コントロールと比較して有意にリンパ球の増殖を抑制した。このことから、本発明の細胞製剤は、コントロールの樹状細胞より抗原提示能が低いことが確認できた。

#### 【0046】

【実施例7】実施例1または3で作製された健康人末梢血由来の樹状細胞を輸血用血液バッグに入れて、X線照射を行い、細胞増殖しないような処理を行った。X線照射は2000Radで行った。このような処理を行い、最終的に抗原提示能が強く抑制された細胞製剤を得た。

#### 【0047】

【発明の効果】本発明によれば、末梢血中などに存在する樹状細胞の前駆細胞から、MHCクラスII、あるいはCD40、CD80、CD86分子の発現を抑制し、抗原提示能を制御させた樹状細胞を作成しうる。この樹状細胞は、リンパ球を効果的に増殖抑制しうることから、優れた細胞製剤として、自己免疫疾患、アレルギーに対する治療および予防に有効である。

#### 【図面の簡単な説明】

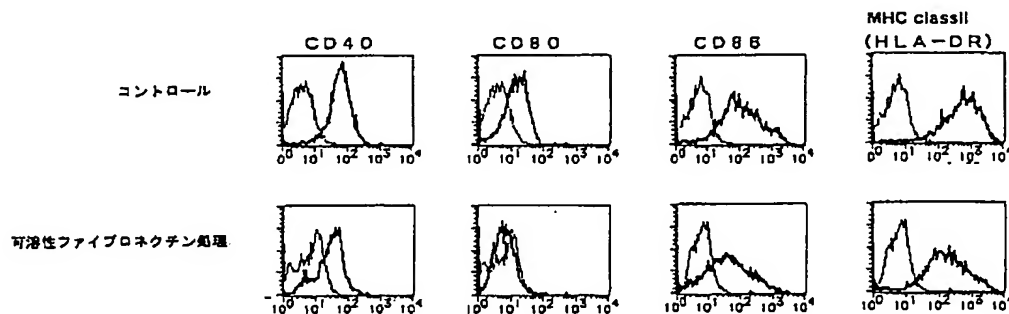
【図1】実施例2の可溶性ファイブロネクチン存在下で誘導した樹状細胞の、フローサイトメーターによる表面抗原の解析結果を示すヒストグラム。

【図2】実施例4の固相化ファイブロネクチン存在下で誘導した樹状細胞の、フローサイトメーターによる表面抗原の解析結果を示すヒストグラム。

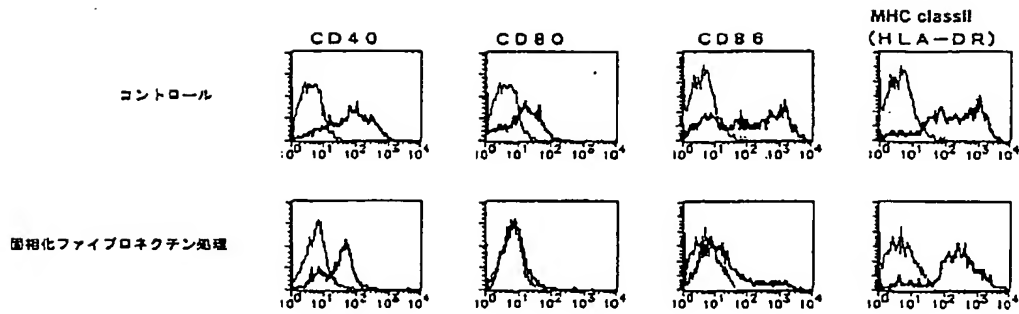
【図3】実施例5の可溶性ファイブロネクチン存在下で誘導した樹状細胞の、リンパ球混合試験による抗原提示能を示す折線グラフ。

【図4】実施例6の固相化ファイブロネクチン存在下で誘導した樹状細胞の、リンパ球混合試験による抗原提示能を示す折線グラフ。

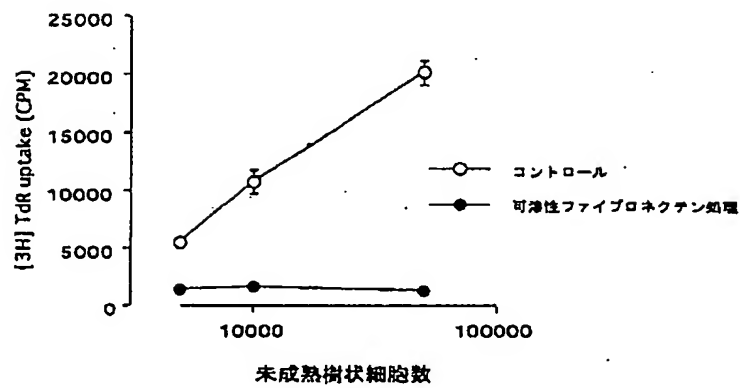
【図1】



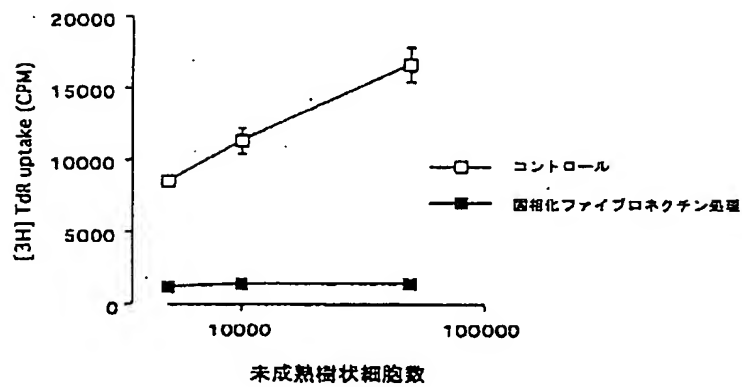
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A61P 37/00  
37/08

識別記号

F I

A61P 37/08  
C12N 5/00

テマコード (参考)

E

Fターム(参考) 4B065 AA94X BB19 BB23 BC01  
BC50 CA44  
4C087 BB33 BB34 BB44 BB59 BB64  
NA14 ZA89 ZB01 ZB13 ZB15